

EZSPHERE®用iPS細胞胚様体形成プロトコール

内容：

1. 実験に必要な細胞、培地、試薬のリスト
2. 基本プロトコール
3. 実施例

旭硝子中央研究所は、再生医療実現拠点ネットワークプログラム(技術開発個別課題; 再生医療に用いるiPS細胞大量培養プラットフォームの開発)の委託を受け開発を実施しています。

1. 実験に必要な細胞、培地、試薬のリスト

	使用試薬 (品番)	販売元	備考
細胞			
ヒトiPS細胞	201B7		
フィーダー細胞	SNL細胞	ReproCELL	
培地・剥離液			
iPS細胞維持培地	霊長類ES/iPS細胞用培地 (#RCHEMD001)	ReproCELL	bFGF (終濃度4 ng/mL)を加えて使用
iPS細胞胚様体形成培地	霊長類ES/iPS細胞用培地 (#RCHEMD001)	ReproCELL	KSR(終濃度5%)とY-27632 (終濃度50 μM)を加えて使用
iPS細胞洗浄液	PBS (#045-29795)	WAKO	
細胞剥離液	CTK (#RCHETP002)	ReproCELL	フィーダー細胞の除去に使用
	Accutase (#A6964)	Sigma-Aldrich	細胞をシングルセル化する際に使用
その他			
血清代替品	KSR (# 10828028)	Life Technologies	胚様体の形成・維持の際に培地に添加
阻害剤	Y-27632 (#253-00513)	WAKO	細胞のシングルセル化時に使用

2. 基本プロトコール

●EZSPHERE®100 mm dishでオンフィーダー培養を行ったヒトiPS細胞を使用する場合の基本プロトコール

フィーダー細胞
の除去

1. オンフィーダー培養したiPS細胞の維持培地を取り除き、9 mLのPBSで洗浄する
2. CTKを1 mL加え、37°Cで1分間処理を行い、フィーダー細胞を剥離させる
3. 9 mLのPBSで2回洗浄し、フィーダー細胞を取り除く

iPS細胞の分散

4. 2 mLのAccutase (50 μ MのY-27632入り) を加えてdish全体に行き渡らせ、37°Cで5分間処理する
5. 胚様体形成培地を8 mL加え、iPS細胞コロニーをピペッティングでシングルセル化させる
6. iPS細胞懸濁液を15 mLチューブへ移し、細胞を遠心分離 (3 min, 190 \times g, 4°C)
7. 上清を取り除き、iPS細胞ペレットを3 mLの胚様体形成培地で懸濁後、細胞数を計測する

胚様体の形成

8. 400~1000 cells/小穴になるようEZSPHERE®にiPS細胞を播種し、培養を開始する
※35 mm dishタイプの標準品 (4000-900)を使用する場合、培養液は2.7 mL/dishになるよう調整する
9. 細胞播種の翌日に半分量の培地 (1.4 mL)をゆっくり取り除き、慎重に等量の新鮮な培地を加える
10. 上記ステップ9の操作を2日置きに行う

※細胞播種後、なるべく培養容器は動かさず、顕微鏡観察なども最小限にする

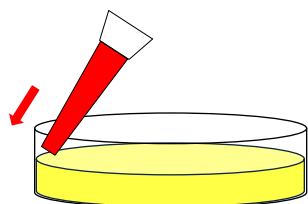
【補足】

● 培地交換について

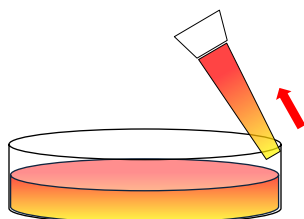
EZSPHERE®は、その底側培養表面に小穴が高密度で配置されているため、単位面積あたりのiPS細胞密度が非常に高くなることや胚様体が小穴から飛び出るリスクがある事から、培地交換を適切な頻度で、慎重に実施する必要がある。

培地交換の方法以下に示す。(35 mm dishを使用の場合で、すべての培地交換操作はDishを平らに静止させた状態でおこなう)。

(A) 2.7 mL培地を交換する



0.9 mLの新鮮な培地を培養容器の壁伝いにゆっくり加える

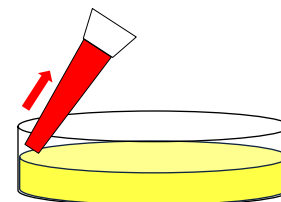


上記で培地を加えた側の反対側から0.9 mLの培地を吸い取る

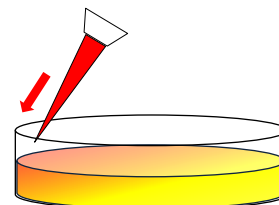


上記二つの操作を3回繰り返す

(B) 1.4 mL (半分量)培地を交換する



1.4 mLの培養液をゆっくりと吸い取る



1.4 mLの新鮮な培地をP200 (200 μ L) のピペットマンを用いて200 μ Lずつ (計7回) 培養容器の壁伝いにゆっくり加える

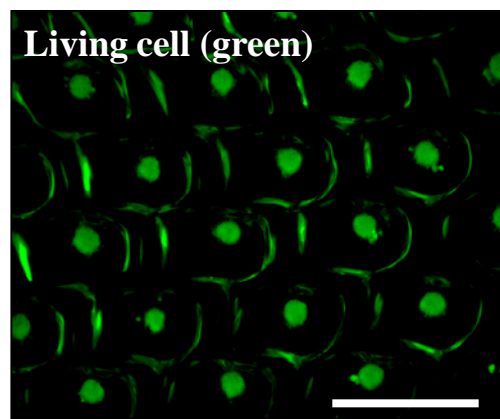
3. 実施例 ① 【均一な胚様体形成】

- iPS細胞：ヒトiPS細胞 201B7 (オンフィーダー培養したもの)
- EZSPHERE®：35 mm dishタイプ (IWAKI, 品種コード4000-900)
- iPS細胞数：400 cell/小穴になるよう細胞密度を調整してから播種 (2.7 mL/ dish)
- 培地：胚様体形成培地 (Primate ES Cell Medium +50 μ M Y-27632, +5% KSR)
- 培養条件：37°CのCO₂インキュベーターで3日間静止培養。細胞播種翌日には半分量の培地を交換

胚様体の観察結果

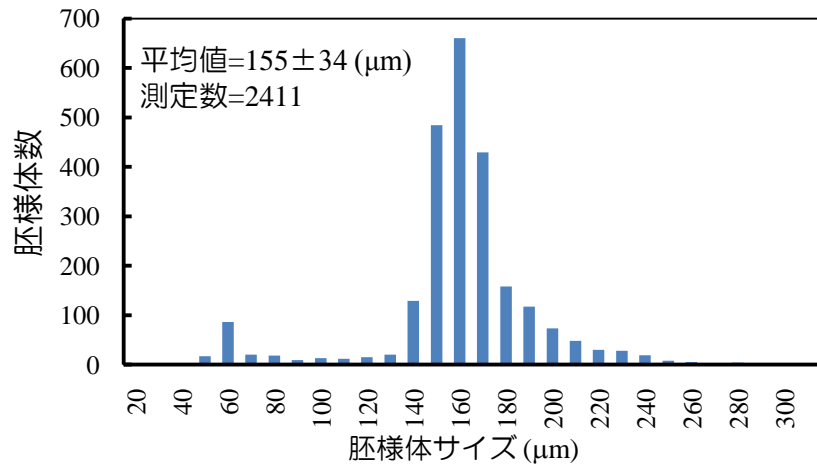


生細胞の蛍光観察結果



Scale bar: 1000 μ m

胚様体サイズの分布

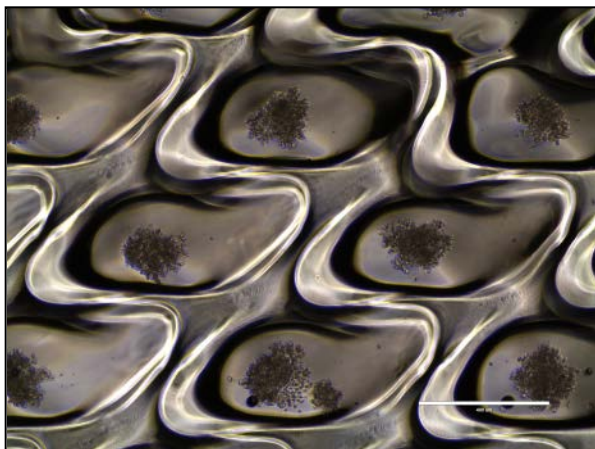


培養3日目に均一な胚様体の形成が観察された(左側 明視野写真)。これらの観察された胚様体に対し、Live/Dead Cell Staining Kit II (PromoKine社) を用いて細胞の生死評価を行ったところ、ほとんどが生細胞であった(右側蛍光写真、緑色の細胞が生細胞)。さらに、形成された胚様体のサイズを計測し、ヒストグラムを作成したところ、160 μ mをピークにもつ胚様体を得られた(右グラフ)。

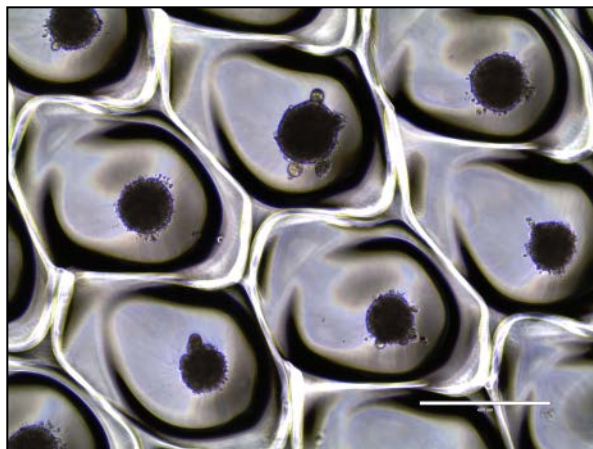
3. 実施例 ② 【胚様体の維持培養】

- 細胞：iPS細胞 (オンフィーダー培養)
- EZSPHERE®：96穴プレートタイプ (IWAKI,品種コード4860-900)
- 細胞数：400 cell/小穴になるよう細胞数を調製し、播種 (200 μ L/well)
- 培地：胚様体形成培地 (Primate ES Cell Medium +50 μ M Y-27632, +5% KSR)
- 培養条件：細胞播種後、2日置きに半分量の培地を交換し、胚様体の様子を撮影

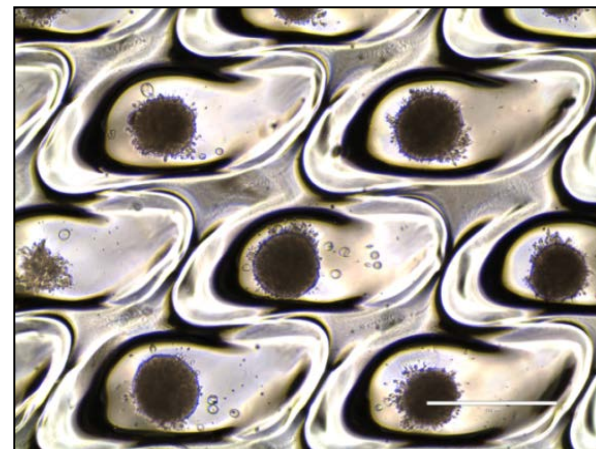
細胞播種翌日 (培養1日目)



培養6日目



培養8日目



Scale bar: 400 μ m

細胞播種翌日にはiPS細胞の凝集が観察された。その後、培地交換しながら培養を継続することで、培養6日目には表面の滑らかな胚様体が形成された。さらに、これらの胚様体は培養8日目には200-250 μ m程度の大きさまで生長した。

【注意点】

- ・一週間程度培養を行う場合、培地交換の作業中に胚様体が小穴から飛び出してしまう恐れがあり、注意して扱う必要がある。
- ・35 mm dishタイプよりも96穴プレートタイプのEZSPHERE®の方が胚様体の飛び出しが起こりにくい傾向にある。